A PROPOS DES INTERACTIONS PLANTE-SOL

I. — Les exsudats foliaires peuvent-ils être une source de substances humiques ?

F. MANGENOT, F. JACQUIN et M. METCHE

Laboratoire de Botanique de la Faculté des Sciences,
E.N.S.A., et Centre de Pédologie du C.N.R.S.,
Laboratoire de Chimie Biologique de la Faculté des Sciences
Nancy (France)

(*Manuscrit reçu le 1-4-1965*)

RESUME

Les feuilles vivantes laissent exsuder, par macération dans l'eau saturée de chloroforme, des « autolysats » qui, chez *Melandryum rubrum*, s'oxydent en fournissant des produits bruns divers : les uns solubles dans l'eau, d'autres solubles dans les réactifs d'extraction des substances humiques, d'autres encore insolubles.

Les fractions solubles dans la soude 0,1 N présentent les caractères généraux des acides humiques : floculation par H^+ et Ca^{++}, spectres visibles et infra-rouges, mobilité électrophorétique, résistance élevée aux actions microbiennes.

Les phénomènes d'oxydation des autolysats se produisent même en milieu aseptique et sont catalysés à pH = 6 par un complexe peroxydasique puissant, extractible des feuilles fraîches.

En présence de sol et surtout d'argile, les phénomènes d'oxydation et de condensation sont très renforcés et fournissent des produits appartenant à toutes les fractions de l'humus, mais surtout aux acides humiques bruns mobiles et aux substances sombres, difficilement solubles et immobiles en électrophorèse.

Les extraits aqueux de feuilles et les produits de lessivage de celles-ci ont une composition proche de celle des autolysats, malgré une moindre concentration. Ils subissent des phénomènes d'oxydation analogues à ceux que nous venons de signaler et enrichissent le sol des mêmes fractions humiques. Ces fractions, enfin, ont été retrouvées en abondance dans l'humus naturel présent sous *Melandryum*, plus que dans le même sol sans *Melandryum*.

On en conclut au rôle des autolysats végétaux et des substances diffusant des feuilles vivantes dans la synthèse des composés humiques.

SUMMARY

« Autolysates » are exuded from living leaves macerated in chloroform-saturated water. In the case studied of *Melandryum rubrum*, the oxydation of these autolysates yields various

brown products, some of which are water soluble, some in extraction reagents for humic acids and some insoluble.

The fractions soluble in NaOH 0,1 N present the general features of humic acids : flocculation by H^+ and Ca^{++}, visible and infra-red spectra, electrophoretic mobility, high resistance to microbial actions.

The oxidation phenomena of autolysates occur even in aseptic media and are catalyzed at pH 6 by a strong peroxydasic complex extractable from fresh leaves.

In presence of soil and especially of clay the oxidation and condensation phenomena are much augmented and yield products belonging to all the fractions of the humus, particularly to the brown mobile humic acids and to the dark substances which are hardly soluble and motionless during the electrophoresis.

The aqueous extracts of leaves and their leaching products show a composition nearly related to that of the autolysates, in spite of a lower concentration. They are submitted to oxidation phenomena similar to those, described above, and add to the soil the same humic fractions. These fractions ultimately have been found in abundance in the natural humus present under *Melandryum* in higher ratio that in the same soil without *Melandryum*.

We conclude that the plant autolysates and the substances diffusing out of living leaves contribute to the synthesis of humic acids.

ZUSAMMENFASSUNG

Lebende Laubblätter scheiden in mit Chloroform gesättigtem Wasser Autolysate aus, die sich bei *Melandryum rubrum* oxydieren, indem sie verschiedene braune Produkte hervorbringen : die einen in Wasser oder in Huminsäuren-Extraktionreagenten löslich, die anderen unlöslich.

Die in NaOH 0,1 n lösliche Fraktionen zeigen Huminsäureneigenschaften : Flokulation durch H^+ und Ca^{++}, infra-rot und sichtbare Spektra, elektrophoretische Beweglichkeit, hoher Widerstand gegenüber Bakterienwirkungen. Die Oxydationserscheinungen von Autolysate treten auch in aseptischem Mittel auf. Bei pH = 6 werden sie durch einen mächtigen, aus den Blättern extrahierbaren peroxydatischen Komplex katalysiert.

In Gegenwart von Boden und vor allem von Ton sind die Oxydations- und Kondensationsphänomene sehr verstärkt und liefern Produkte die allen Humusfraktionen, besonders aber braunen beweglichen Huminsäuren und dunkeln schwerlöslichen in der Elektrophorese unbeweglichen Substanzen angehören.

Die wässerigen Extrakte von Blättern und deren Auswaschungsprodukte haben eine, der Autolysate nahe Zusammensetzung trotz minderer Konzentration. Sie sind denselben Oxydationsphänomene unterzogen die wir schon erwähnt haben, und reichern den Boden mit denselben Huminfraktionen an. Diese Fraktionen sind in grösserer Menge in dem angeborenen Humus unter *Melandryum* als in demselben Boden ohne *Melandryum* gefunden worden.

Es ist daraus zu folgern, daß die Pflanzenautolysate und die Stoffauscheidungen von Blättern eine Grosse Rolle in der Synthese der Huminsäuren spielen.

INTRODUCTION

On sait depuis longtemps (ARENS, 1934) que les feuilles vivantes laissent exsuder à leur surface des sels minéraux et des composés organiques qui peuvent ensuite être lessivés et entraînés dans le sol par la pluie. Les quantités ainsi excrétées sont très appréciables et, pour la matière organique seule, DALBRO (1955) les estime à 1 tonne par hectare et par an dans un verger de pommiers. Selon MORGAN et TUKEY (1964) on y rencontre des acides aminés, plus ou moins semblables chez toutes les plantes, des acides organiques plus spécifiques et divers

glucides. Mais il n'est pas douteux que d'autres substances s'y rencontrent encore, en particulier des polyphénols dont COULSON et al. (1960) ont envisagé le rôle éventuel dans la mobilisation du fer.

Même si l'excrétion foliaire varie en importance avec l'âge de la plante et de ses organes, avec la saison, etc..., il y a là un phénomène digne d'intérêt (cf. la question de SCHARPENSEEL in TUKEY et TUKEY, 1962) mais dont l'étude présente certaines difficultés en raison de l'extrême dilution des solutions fournies par le lessivage des feuilles vivantes.

D'autre part, à la mort des tissus, la perméabilité élective cellulaire est supprimée parce que les processus libérateurs d'énergie sont eux-mêmes suspendus. Une première catégorie de substances est ainsi à même de diffuser à l'intérieur et hors des cellules : elle comprend, entre autres, des enzymes solubles ou même libérés de certains organites cytoplasmiques par l'altération des structures fondamentales. Sous leur action se produisent des phénomènes d'autolyse conduisant à la fragmentation de composés tels que les hétérosides. On obtient ainsi des solutions complexes renfermant un grand nombre de substances actives — par exemple, les polyphénols sont plus réactifs que les hétérosides correspondants — et des processus biochimiques interviennent plus ou moins rapidement. Les sucs s'oxydent en présence d'air, des réactions de condensation se produisent, entraînant l'édification de substances complexes, colorées, de moins en moins solubles au fur et à mesure qu'elles se polymérisent.

Dans les conditions normales, ces processus sont compliqués par des actions microbiennes qui peuvent débuter dès la mort des organes et se poursuivent lorsque les produits lessivés sont absorbés par le sol. Leur intervention ne peut manquer de rendre l'analyse des phénomènes naturels et surtout leur interprétation extrêmement délicates.

Il est possible, *in vitro*, de supprimer la semi-perméabilité cellulaire par chauffage à 60° ou par exposition des tissus aux vapeurs d'éther ou de chloroforme. En opérant en présence d'eau on obtient des liqueurs riches en matières organiques mais de composition un peu différente suivant la technique utilisée. Si l'on emploie les solvants volatils, les processus enzymatiques semblent généralement conservés et l'on assiste à une autolyse, sans doute artificielle, mais ayant toute chance de rappeler les phénomènes naturels. La méthode a été utilisée plus d'une fois avant nous (HANDLEY, 1954 - GOLTERMAN, 1960) et nous désignerons les liqueurs qu'elle fournit sous le nom d'*autolysats*.

On sait enfin que les autolysats de feuilles de diverses espèces précipitent plus ou moins vite et abondamment. L'un d'entre nous (MANGENOT, 1961) signalait en particulier la formation très rapide d'un important précipité noir dans le cas de *Melandryum rubrum* et nous nous sommes demandés aussitôt s'il n'y avait pas analogie entre ce précipité et les substances humiques. Les premiers tests semblant

confirmer notre hypothèse, nous avons entrepris les recherches dont nous rendrons partiellement compte ici. Sans doute *Melandryum rubrum* n'est-il pas une espèce d'un bien grand intérêt phytosociologique : son caractère le plus remarquable est peut-être sa nitratophilie; mais les actions spectaculaires dont ses autolysats sont le siège nous l'ont désigné comme un matériel particulièrement favorable à la mise en évidence de processus conduisant à l'accumulation dans le sol de produits bruns plus ou moins condensés.

Dans une première partie, nous décririons les caractères des autolysats de feuilles de *Melandryum* et des précipités qui s'y forment.

La seconde partie de ce travail sera consacrée au comportement des autolysats en présence du sol.

Enfin nous comparerons aux données précédentes des indications obtenues dans des conditions plus naturelles, par lessivage des feuilles vivantes.

PREMIÈRE PARTIE

LES AUTOLYSATS DE *MELANDRYUM RUBRUM*

1. Préparation.

Les feuilles fraîches débarrassées de la région pétiolaire sont placées dans une fiole conique et recouvertes de deux fois leur poids d'eau saturée de chloroforme. Les quantités utilisées doivent être telles que le récipient soit plein. On le bouche hermétiquement et le conserve à + 4° C pendant au moins une nuit; mais une macération plus prolongée n'a pas d'inconvénient si le récipient est étanche aux gaz. Au moment de l'emploi, le contenu de la fiole est exprimé puis le liquide filtré sur coton de verre ou bien sur papier sous pression réduite. Il est essentiel que toutes les opérations précédentes soient aussi rapides que possible en raison de l'instabilité de l'autolysat. Finalement celui-ci est additionné d'un excès de chloroforme pour éviter les fermentations puis réparti en couche mince dans des fioles bouchées au coton, que l'on conservera à + 4° C pendant le temps désiré.

2. Caractères des autolysats.

Le liquide obtenu comme nous venons de l'indiquer est limpide, ambré pâle; très vite il passe, à partir de la surface, au pourpre puis au brun-noir et la formation du précipité, déjà bien visible après 30 min se poursuit à un rythme rapide pendant 48 h environ. Elle se prolonge ensuite pendant plusieurs semaines,

mais avec une extrême lenteur. Aussi, le plus souvent, conservons nous les autolysats en oxydation pendant deux mois.

Il convient de préciser que, pendant cette période, ils ne sont le siège d'aucun développement microbien visible. Des numérations de germes effectuées par culture sur des milieux nutritifs gélosés (extrait de malt et peptone) montrent que, si la présence de chloroforme ne suffit pas à stériliser le milieu, elle entraîne une diminution progressive du nombre des microorganismes : dans le liquide fraîchement filtré on compte, par ml, 500 000 bactéries, 20 000 champignons et 2 000 actinomycètes, mais 9 jours plus tard, les chiffres sont ramenés à 200 000 bactéries, 20 000 champignons et les actinomycètes ont disparu.

Enfin, à de nombreuses reprises, nous avons stérilisé des autolysats par filtration sur bougie de porcelaine L 5 et la stérilité du filtrat a été contrôlée par mélange à parties égales avec un milieu nutritif. Or dans les liqueurs aseptiques, les mêmes phénomènes de brunissement se produisent, démontrant ainsi qu'ils ne résultent pas d'activités microbiennes. Cependant la fitration sur porcelaine a l'inconvénient de retenir une partie des substances actives de l'autolysat et l'on ne peut donc y recourir en toute occasion.

La concentration des autolysats en matière sèche varie peu : elle est généralement voisine de 1,3 %. Le pH s'échelonne de 6,0 à 6,3 tandis que le rapport C/N est inconstant, compris entre 15,5 et 29. Mais ces dernières valeurs restent basses en comparaison de celles obtenues pour d'autres plantes ne possédant pas le caractère nitratophile de *Melandryum*.

Le taux de précipitation, c'est-à-dire le rapport du poids de précipité après 60 jours au poids de matière sèche de l'autolysat semble présenter des fluctuations saisonnières : au printemps et jusqu'à la floraison, il reste bas, au maximum 6 % pour les feuilles basilaires tandis que celles de la hampe florale ne fournissent qu'un précipité négligeable. Le taux se fixe vers 10 % à partir d'août-septembre pour atteindre 12-14 % en décembre-janvier.

Pendant les grands froids, les feuilles de *Melandryum* subissent des altérations partielles : elles fournissent des autolysats relativement concentrés (2 %) et dont le taux de précipitation atteint 12 %. Par simple macération dans l'eau distillée on obtient un extrait titrant encore 0,75 % de matière sèche mais dont le taux de précipitation n'est que de 2 %. De plus, à cette époque, les précipités obtenus sont d'un noir intense, pauvres en N (C/N = 75) et de propriétés particulières.

3. Caractères des précipités.

Caractères généraux :

Les précipités frais sont presque entièrement solubles dans les solutions alcalines diluées. Cependant, préparés à partir de feuilles gelées, une fraction notable

(22 %) est insoluble dans la soude 0,1 n; il en est de même des extraits aqueux des mêmes feuilles dont le précipité est soluble à moins de 50 %.

Quelle que soit leur origine (feuilles saines ou gelées) la solubilité des précipités dans NaOH 0,1 n diminue après dessication. Ils se dissolvent très partiellement dans l'éthanol à 96 %.

Leurs solutions alcalines réduisent à froid $AgNO_3$ ammoniacal mais non la liqueur de Fehling.

Ces mêmes solutions précipitent par acidification à pH 1 ainsi qu'en présence d'ions Ca^{++} vis-à-vis desquels elles montrent une extrême sensibilité. Ce dernier caractère présente des conséquences évidemment importantes pour l'évaluation des sols et constitue un critère intéressant pour la définition des types de composés humiques; aussi indiquerons-nous dans le tableau I les données que nous avons recueillies; elles concernent des solutions sodiques à 136 mg de C/litre de précipités spontanés formés dans les autolysats de trois espèces végétales ainsi que d'acides humiques extraits de deux sols. Les valeurs indiquées représentent la baisse de densité optique (exprimée en % de la valeur dans le produit frais) 24 h après addition d'une solution de $CaCl_2$. Avant passage au photocolorimètre, le mélange est centrifugé et la lecture faite sur le surnageant. On voit que le taux de floculation des précipités de *Melandryum* est élevé, supérieur à celui des acides humiques pour les faibles concentrations en Ca^{++}, sensiblement identique à partir de 30 m. équiv/l.

TABLEAU I

Sensibilité des produits de brunissement et des acides humiques vis-à-vis des ions Ca^{++}.

Ca^{++} (M. équiv./l.)	10	20	30	40	60	80
Précipités de *Melandryum rubrum*	66,5	84,0	90,0	91,0	92,0	93,0
Ranunculus repens ..	0	≃ 0	6,0	30,0	44,0	51,0
Digitalis purpurea ...	0	0	0	0	0	0
Acides humiques de sol sous *Melandryum*	12,0	51,5	88,0	92,0	94,0	95,0
sol sous *Cornus mas.*	8,0	41,0	84,0	88,0	91,0	—

$$\text{Résultats exprimés par le taux de floculation} = 100 - \frac{\text{d. optique après 24 h.}}{\text{d. optique du témoin}} \times 100$$

Propriétés optiques :

Dans le domaine visible, les spectres des solutions de précipité présentent la même allure générale que ceux des acides humiques : leur densité optique croît de façon continue en même temps que la longueur d'onde diminue. On notera que le rapport Q 4/6 selon WELTE prend une valeur particulièrement basse (2,5 - 2,9) apparentant les précipités de *Melandryum* aux acides humiques des sols noirs. Dans le cas de rendzines prélevées sous *Melandryum* ou sous *Cornus*, ce même rapport s'établit à 4,6 et 5,1 respectivement.

Dans l'infra-rouge, différents produits ont été étudiés après dessication à + 60° et incorporation à des pastilles de KBr selon la technique utilisée par JUSTE (1964). Les spectres obtenus sont représentés dans le graphique 1 et concernent les composés suivants :

1. Précipité spontané d'autolysat de *Melandryum,* recueilli par centrifugation lavé et séché à la température du laboratoire.

2. Fraction obtenue à partir d'un précipité semblable, mais non desséché, par extraction par $Na_4P_2O_7$ 0,1 m puis précipitation par HCl à pH 1.

3. Produit obtenu par acidification à pH 1 du surnageant limpide d'un autolysat oxydé de *Melandryum.*

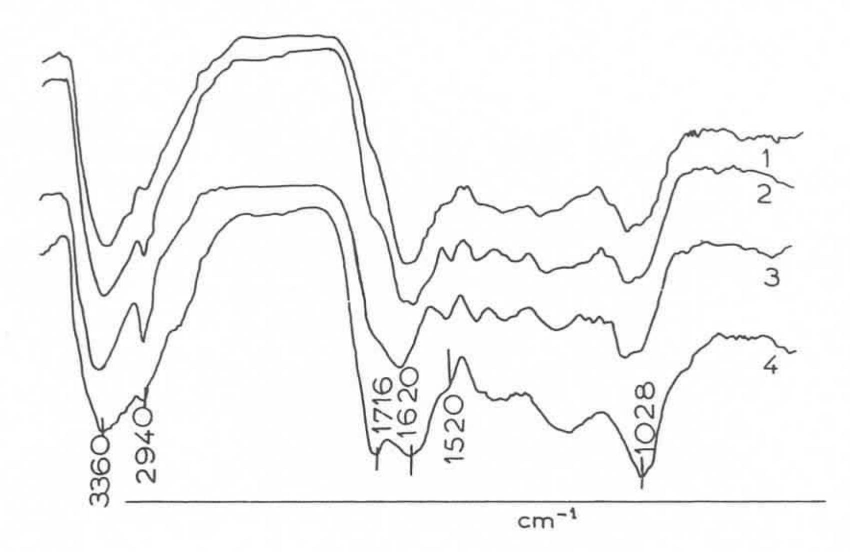
4. Acides humiques préparés exactement dans les mêmes conditions qu'en 2. à partir d'un hydromull calcique riche en composés gris très polymérisés.

Rappelons que les bandes caractéristiques des différents groupements sont les suivantes : 3400 cm^{-1} : OH; 2940 cm^{-1} : CH, CH_2, CH_3; 1720 cm^{-1} : C = O; vers 1620 cm^{-1} : C = C, vibration des liaisons de valence aromatiques; vers 1220 cm^{-1} : COOH.

Le simple examen du graphique 1 montre que ces différentes bandes se retrouvent avec des intensités voisines dans les différents spectres. En particulier si l'on compare les courbes 2 et 4 correspondant aux produits d'oxydation des autolysats et à des acides humiques naturels, leurs analogies sont telles qu'il paraît impossible de les distinguer pratiquement : si les deux produits sont présents simultanément dans un sol naturel, leurs propriétés optiques ne permettent pas de les différencier.

Selon certains auteurs et, en particulier tout récemment, SCHARPENSEEL et al. (1964) les spectres I.R. d'acides humiques provenant de sols d'origines génétiques variées et de systèmes dynamiques correspondant à des mécanismes réactionnels divers ne permettent pas d'y reconnaître de différences structurales essentielles. Cependant si l'on compare les courbes 1, 2 et 3, correspondant à des substances inégalement condensées, il est possible de découvrir quelques variations

dans l'intensité de certaines bandes et d'en tirer des indications concernant l'évolution de nos produits. Tout récemment, JOHNSTON (1965) relevait des variations du même ordre en comparant les spectres de la lignine et d'acides humiques bruns.



GRAPHIQUE 1. — Spectres dans l'Infra-Rouge de divers produits :
1 : précipité lavé et séché d'un autolysat de *Melandryum;*
2 : fraction extractible par $Na_4P_2O_7$ à partir d'un précipité non désséché;
3 : précipité obtenu à pH 1 à partir du surnageant d'un autolysat oxydé et centrifugé.
4 : acide humique d'hydromull calcique.
Autres explications dans le texte.

Lorsqu'on passe du spectre 3 (produits hydrosolubles) jusqu'au spectre 1 (produit insoluble même dans les liqueurs alcalines concentrées) on remarque les transformations suivantes :

— la bande caractéristique des CH (2940 cm^{-1}) montre un affaiblissement très net et tend vers la valeur qu'elle présente dans l'acide humique naturel 4;

— il en va de même de la bande 1520 cm^{-1} correspondant aux vibrations de déformation dans le plan des noyaux benzéniques. Cette bande ne présente plus qu'une légère inflexion dans les acides humiques condensés (n° 4) mais nous l'avons observée dans le spectre d'acides humiques peu polymérisés (Ao d'un podzol);

— on constate aussi une diminution de la bande 1455 cm^{-1} qui, si elle n'est pas caractéristique des composés humiques, se manifeste dans les cas où les cycles aromatiques sont substitués en 1,2,3;

— la bande 1720 cm^{-1}, très marquée dans l'acide humique 4 diminue dans nos produits quand leur degré de condensation augmente. Ceci témoigne probablement d'une diminution des composés carbonylés aromatiques et *O*-quinoniques.

Ainsi l'évolution des produits de brunissement de *Melandryum* correspondrait, dans l'ensemble, à une transformation des composés aromatiques au fur et à

mesure d'une polymérisation plus intense. Comme la teneur en N reste invariable dans les trois cas étudiés, nous serions tentés de croire à la possibilité de rupture des cycles aromatiques avec formation éventuelle d'hétérocycles azotés.

4. Oxydation des extraits aqueux et des autolysats de feuilles de *Melandryum*.

Nous avons constaté précédemment que l'oxydation des autolysats de *Melandryum* ne semblait pas déterminée par des actions microbiennes et paraissait se produire spontanément. Pour préciser la nature du mécanisme de cette oxydation, nous avons étudié le comportement d'extraits aqueux et d'autolysats par macération pendant 36 h, en l'absence d'air, de 27 g de feuilles fraîches dans 300 ml d'eau distillée pure ou additionnée de chloroforme.

Si l'on introduit 10 ml d'extrait aqueux dans une fiole de Warburg et si l'on détermine l'absorption d'oxygène au cours des 3 premières heures, on peut dresser la courbe (a) reproduite sur le graphique 2. Elle est caractérisée par une phase d'absorption rapide et de courte durée suivie d'une phase lente qui se poursuit dans le temps.

Trois hypothèses peuvent être avancées pour expliquer le phénomène d'oxydation :

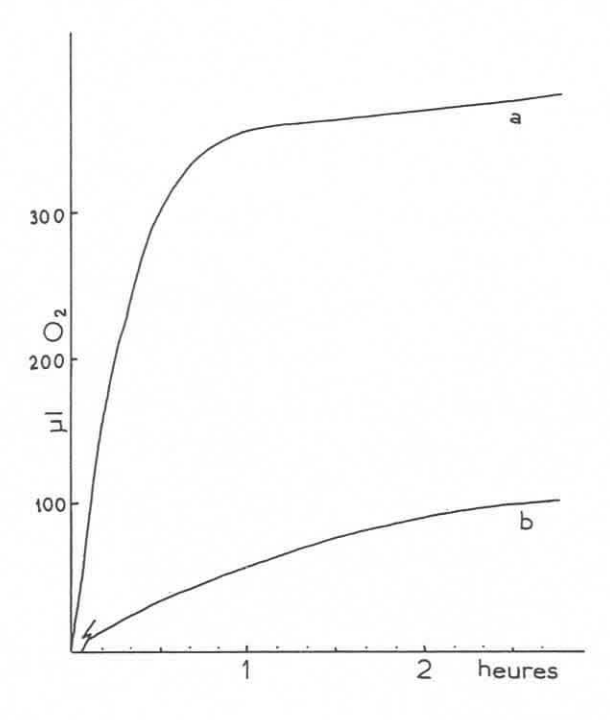
— auto-oxydation de substances ayant diffusé dans le milieu aqueux. Ce type de réaction est généralement catalysé par des traces de métaux lourds, Cu ou Fe;

— l'absorption d'oxygène est due au développement de microorganismes;

— l'oxydation est d'origine enzymatique.

Pour répondre à la première hypothèse, nous avons suivi l'absorption d'oxygène d'extraits aqueux préalablement portés à l'ébullition à 100°C sous atmosphère d'N, pendant 10 min. L'absorption d'oxygène est alors négligeable, du moins à pH 6. Des essais effectués à pH plus élevé (7,5 - 9) montrent que cette réaction prend de l'importance et se manifeste aussi par un brunissement des solutions.

Pour éviter le développement des microorganismes au cours de la macération, nous avons ajouté 2 ml de $CHCl_3$ à une suspension de 27 g de feuilles dans 300 ml d'eau. Après 36 h on introduit, comme précédemment, 10 ml d'extrait dans une fiole de Warburg. Mais dans ces conditions la lecture des résultats est fortement perturbée par la destruction du $CHCl_3$ au contact de la solution de KOH concentrée destinée à fixer le CO_2 apparu en cours d'oxydation. On ne peut de ce fait obtenir des résultats satisfaisants si ce n'est toutefois montrer qualitativement l'absorption d'oxygène et préciser que l'oxydation prend donc encore place. (Courbe (b) graphique 2).



GRAPHIQUE 2. — Consommation d'oxygène par un extrait aqueux de *Melandryum* (a) et un autolysat (b). Dans ce dernier cas, la courbe ne tient compte que de l'absorption d'O_2 après la fin de la réaction du $CHCl_3$ sur KOH.

La troisième hypothèse se trouve donc confirmée d'elle-même; il s'agit bien d'une réaction d'oxydation enzymatique mettant en cause les substrats et les enzymes qui ont diffusé à travers les parois cellulaires au cours de la macération.

Pour préciser la nature enzymatique du processus d'oxydation, nous avons été amenés à mettre en évidence la présence, dans les extraits aqueux et les autolysats d'un complexe peroxydasique. Cette présence peut être révélée :

a) à l'aide du réactif H_2O_2, catéchol, aniline par la formation de 4,5-dianilino-*O*-benzoquinone :

C_6H_5NH — =O
C_6H_5NH — =O

b) avec une solution aqueuse d'*O*-phenylène-diamine et d'H_2O_2, avec formation de 2,3-diaminophénazine :

N
NH_2
NH_2
N

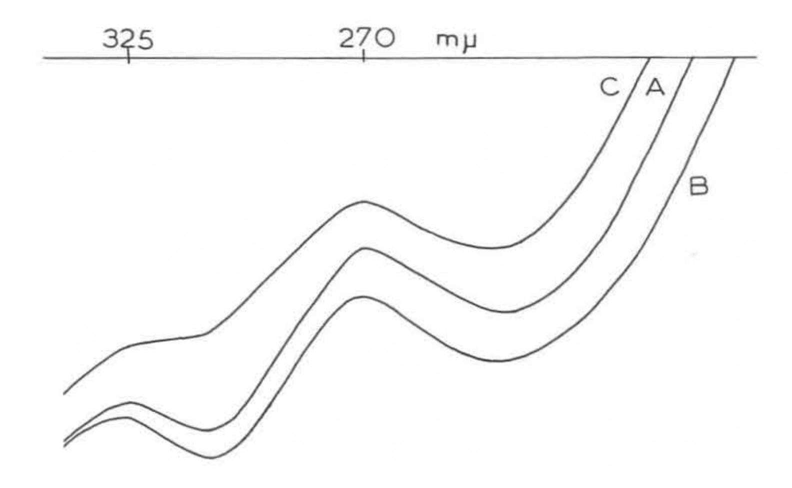
L'intensité et la rapidité de ces réactions montrent, sans équivoque, la grande activité de ces enzymes dans les extraits aqueux et les autolysats de feuilles.

De même la poudre acétonique préparée à partir de 20 g de feuilles fraîches et qui contient l'ensemble des enzymes, plus ou moins dénaturés, manifeste une activité peroxydasique et catalasique intense; par contre l'activité oxydasique, mesurée au Warburg paraît très ralentie.

5. Modification, au cours de l'oxydation, du spectre d'absorption U.V. des extraits et des autolysats de *Melandryum*.

Les spectres d'absorption U.V. sont intéressants pour préciser éventuellement la nature des substances qui subissent l'oxydation.

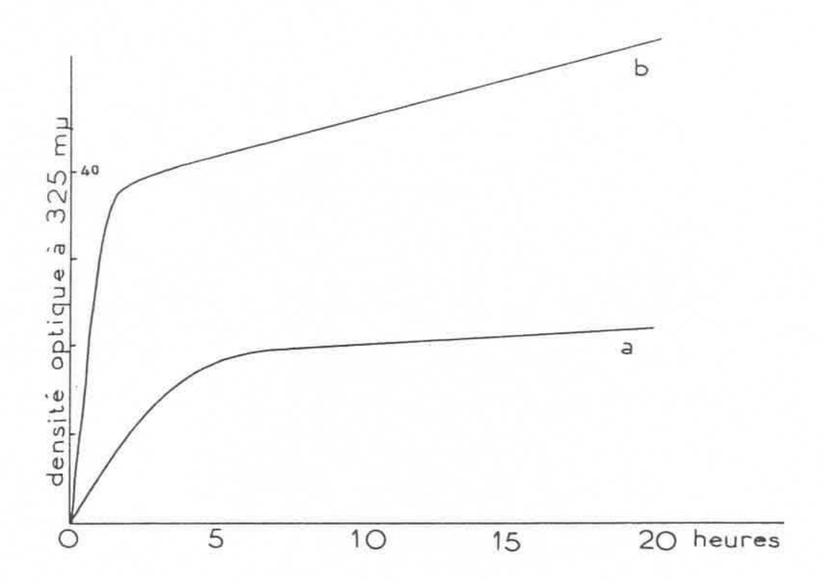
Les spectres des extraits et des autolysats, avant oxydation, sont très voisins; ils présentent deux maxima d'absorption caractéristiques à 325 et 270 mμ (graphique 3). On peut donc penser que ces extraits sont très voisins et contiennent des substances de même nature, notamment à caractère phénolique. Toutefois l'autolysat contient, dans les conditions expérimentales précisées ci-dessus, environ deux fois plus de substances diffusées, caractérisées par les maxima d'absorption 270 et 325 mμ.



Graphique 3. — Spectres d'absorption dans l'Ultraviolet de :
A : extrait aqueux de feuilles de *Melandryum*, fraîchement préparé.
B : autolysat de feuilles, fraîchement préparé et dilué deux fois.
C : le même après 21 h. d'exposition à l'air.

L'oxydation des extraits fait apparaître un accroissement d'absorption de ces mêmes maxima sans qu'il y ait déformation importante de l'ensemble du spectre; cependant l'augmentation de l'absorption au voisinage du minimum 302 mμ nous paraît caractéristique de l'oxydation. Cette modification semble indiquer que le

maximum caractéristique de l'absorption des produits formés au cours de l'oxydation se situe entre 320 et 290 mμ.



GRAPHIQUE 4. — Evolution de la densité optique dans l'U. V. en fonction de l'oxydation d'un extrait aqueux (a) et d'un autolysat (b) de *Melandryum*

Nous avons porté, graphique 4, les variations d'absorption à 325 mμ des extraits aqueux (courbe a) et des autolysats (courbe b) en fonction du temps d'oxydation. On peut en conclure que la marche du processus d'oxydation est différente dans les deux cas : chez les extraits aqueux, le phénomène tend progressivement vers une limite, tandis que la solution prend une teinte grisâtre.

L'oxydation de l'autolysat présente nettement deux étapes, la première correspond à un processus rapide, la seconde, qui lui fait suite, correspond à un processus d'absorption plus lent qui se poursuit dans le temps tandis que la solution prend une teinte brun foncé.

Ainsi, bien que les substances diffusées en milieu aqueux et aqueux chloroformique présentent des spectres d'absorption U.V. très voisins, l'oxydation de l'autolysat est plus importante. On sait déjà que le chloroforme facilite la diffusion des sucs cellulaires dans le milieu aqueux, mais il est possible, en même temps, qu'il détermine le « décrochage » d'enzymes spécifiques qui seraient responsables en particulier du brunissement plus profond des autolysats.

6. Résistance des précipités aux actions microbiennes.

Nous avons procédé à de nombreux essais dont nous ne croyons pas devoir rendre compte en détail, leurs résultats étant parfaitement concordants.

Nous avons utilisé pour les réaliser la technique mise au point par SØRENSEN

(1962) pour la reherche des bactéries dégradant la lignine : dans des boîtes de Pétri, on prépare des disques de silico-gel salin stérile. Sur ces derniers on coule un mélange aseptique de silico-sol, d'une solution minérale et d'une suspension de produit dont on désire étudier la décomposition. Le pH final que nous avons adopté est généralement de 6,0, mais des essais ont aussi été effectués à pH 5,5 et pH 7,0. L'ensemencement est réalisé, soit par inoculation de cultures pures, de fragments de feuilles pourrissantes de *Melandryum* ou de grains de terre, ou bien encore on ajoute au mélange de silico-sol et de sels une suspension de terre.

Une première série d'expériences a porté sur la fraction du précipité soluble dans NaOH 0,1 n. La solution est reprécipitée à pH 1 et le culot est lavé à l'éthanol à 96 % jusqu'à l'obtention de liqueurs alcooliques incolores. Le résidu solide est mis en suspension et utilisé tel quel ou après stérilisation 20 min à + 120°C. L'inoculum consistait en une suspension de sol prélevé sous feuilles pourrissantes de *Melandryum.* Lorsque le produit a été stérilisé, il permet une croissance bactérienne éparse : 100 colonies à partir d'1 ml d'inoculum. Le produit non chauffé est encore moins favorable (3 colonies).

Nous avons d'autre part utilisé, dans les mêmes conditions une suspension de la fraction insoluble dans NaOH 0,1 n d'un précipité obtenu à partir d'autolysat de feuilles gelées. Le produit stérilisé semble plus fragile (600 colonies) et des auréoles étroites et plus pâles apparaissent autour de certaines cultures. Sur le produit non chauffé, se développent quelques champignons (40 colonies) mais aucune décoloration ne se produit.

D'autre part, nous avons utilisé divers produits obtenus à partir de feuilles gelées : les précipités lavés à l'eau d'un extrait aqueux et d'un autolysat ainsi que les fractions soluble et insoluble dans NaOH 0,1 n de ce dernier. Les résultats sont semblables dans tous les cas, que le milieu soit ou non additionné de glucose. Les cultures pures de 5 espèces bactériennes sélectionnées pour leur aptitude à décolorer la fraction hydrosoluble des autolysats de *Melandryum* ne se développent pas. Deux Hyménomycètes lignivores et *Margarinomyces heteromorpha* poussent médiocrement sans attaque visible des particules de substrat. Seuls deux *Streptomyces* isolés de feuilles pourrissantes de *Melandryum* ont présenté une assez belle croissance. Lorsqu'on utilise pour inoculum des particules de sol (mull calcique, mull acide, mor, terreau acide) on voit se développer autour de chaque grain de terre une petite cénose : amibes, nématodes, Acrasiales, *Trichoderma, Fusarium, Penicillium,* mais la croissance est extrêmement pauvre, les mycéliums réduits à quelques hyphes éparses. Seuls les *Streptomyces*, toujours présents, montrent une certaine vigueur, tandis que les bactéries sont rares. En aucun cas on n'observe de décoloration même partielle du milieu.

Sans doute, ces essais n'ont-ils pu être poursuivis que pendant un temps limité de l'ordre de 2 mois en moyenne; ils montrent cependant que les précipités apparus

aussi bien dans les autolysats que dans les extraits aqueux de feuilles gelées présentent une très grande résistance aux agents biologiques de dégradation. C'est un caractère supplémentaire rapprochant nos produits d'acides humiques naturels assez condensés.

DEUXIÈME PARTIE

COMPORTEMENT DES AUTOLYSATS DE *MELANDRYUM* EN PRÉSENCE DE SOL

Le comportement des autolysats en présence de sol a été étudié sur des micromonolithes suivant une technique décrite ailleurs (JACQUIN et MANGENOT, 1964). Rappelons seulement que les micromonolithes sont d'abord imbibés d'autolysats frais et filtrés, puis on les sèche rapidement et après trois traitements semblables, on en élimine les substances hydrosolubles par un abondant lessivage.

Nos essais ont porté sur quatre types de sols : sable blanc, sable ferrugineux (grès vosgien), grès vosgien additionné d'argile (grès bigarré) et enfin rendzine agricole argilo-calcaire.

Dans le cas des deux sables, plus de 40 % (40.8 et 42 %) du C apporté au cours des trois imbibitions ont été fixés sur le sol tandis que l'autolysat, en milieu liquide est insolubilisé dans une proportion toujours inférieure à 15 %. Cette différence de comportement doit être attribuée à la dessication, dont on sait qu'elle favorise la polymérisation des composés humiques. Mais la matière organique est très faiblement liée aux particules de sable : elle les enrobe d'une pellicule que l'on peut séparer par agitation prolongée dans l'eau, suivie de centrifugation fractionnée.

Dans le cas du mélange de grès vosgien et d'argile, le taux de fixation dépasse 60 % et l'on ne peut plus séparer par des moyens mécaniques la matière organique du support minéral.

Quant à la rendzine, l'interprétation des résultats est plus délicate, ce sol étant déjà riche en matière organique dont une partie est entraînée au moment du lessivage. Cependant par différence avec un témoin, on peut évaluer à 86 % la proportion des composés organiques apportés et fixés sur le sol.

Tout se passe donc comme si les colloïdes argileux retenaient dans une large mesure les constituants de l'autolysat et facilitaient leur transformation en composés polymérisés, sombres, insolubles dans l'eau : on a l'impression d'assister à la formation immédiate d'un complexe argilo-humique.

Si l'on compare la répartition, entre les différents horizons du micromonolithe, de la matière organique apportée, on remarque que, avant le lessivage, les 10 cm superficiels sont généralement deux fois plus riches que la couche inférieure (15-20 centimètres). Après lessivage, cette répartition devient beaucoup plus uniforme : les horizons inférieurs renferment entre 75 et 95 % du taux de C de l'horizon supérieur correspondant et ils se sont distinctement enrichis, comme si la matière organique accumulée en surface gardait une certaine aptitude à migrer et à se fixer sur des argiles non encore saturées.

Si l'on soumet enfin les micromonolithes à l'action des solvants de l'humus, on constate qu'une fraction importante des substances néoformées n'est pas extractible. Même en employant un agent brutal comme le pyrophosphate de sodium à pH 12, on n'entraîne que 35 % du C retenu par les 10 cm supérieurs d'un monolithe de sable blanc et 68 % pour les 10 cm inférieurs. On en peut conclure que si la répartition quantitative du C est assez uniforme dans la colonne, des différences qualitatives existent : les substances les plus polymérisées se sont formées rapidement, à partir de précurseurs de faible mobilité. Du point de vue de leur solubilité, ces substances sont comparables à l'humine et n'importe quelle méthode d'analyse appliquée à notre « sol synthétique » les classerait dans cette catégorie. Pourtant leur formation est quasi instantanée alors que l'humine est considérée comme le résultat d'une lente maturation de précurseurs moins condensés.

L'extraction des micromonolithes de sable révèle encore la présence d'une fraction brune très abondante, mobile, extractible par le réactif $Na_4P_2O_7$ + NaCl ou même hydrosoluble mais précipitant en grande partie à pH 1.

L'étude comparée d'un micromonolithe de rendzine traitée et d'un témoin fournit des indications concordantes : l'extraction par l'eau entraîne, dans le premier cas, une grande quantité d'acides humiques bruns solubles, alors que le sol non traité ne fournit, dans les mêmes conditions que des acides fulviques. Par contre après épuisement, par le réactif $Na_4P_2O_7$ + NaCl, on obtient par traitement au Pyrophosphate 0,1 n un mélange d'acides humiques bruns et gris dans le rapport 2/1, aussi bien dans le cas du sol traité que du témoin.

L'ensemble de ces données permet de penser que l'autolysat de *Melandryum* enrichit le sol, d'une part en composés très difficilement extractibles ou même analogues à l'humine, d'autre part en acides humiques bruns, mobiles et partiellement hydrosolubles sans modifier la répartition des autres fractions de l'humus.

TROISIÈME PARTIE

LES EXSUDATS DE *MELANDRYUM* DANS LA NATURE

Il est incontestable que les résultats mentionnés dans les pages précédentes ont été obtenus dans des conditions artificielles, aussi nous a-t-il paru indispensable de chercher dans quelle mesure leurs indications correspondaient aux phénomènes naturels.

Les feuilles vertes de *Melandryum*, séchées à l'air, à la température ordinaire, comme après fauchage, fournissent par simple macération aqueuse des extraits possédant un certain nombre de caractères communs avec nos autolysats : mêmes concentration et C/N, taux de floculation voisin, mais les précipités formés ne semblent pas présenter les mêmes caractéristiques. On sait d'ailleurs que les polyphénols des feuilles sont en partie détruits au cours de la dessication à température ordinaire (COULSON et al., 1960). Aussi n'avons-nous pas poursuivi nos recherches dans cette direction.

Nous avons déjà souligné que la sénescence et la nécrose, dans la nature, conduisaient à des phénomènes d'autolyse probablement analogues à ceux que nous avons réalisés par traitement à l'eau chloroformée. Il est difficile d'établir ces similitudes éventuelles car les feuilles des rosettes de *Melandryum* meurent les unes après les autres pendant presque toute l'année et l'on n'en peut guère obtenir d'échantillon homogène et de poids suffisant. Cependant, nous avons soumis à analyse trois lots de feuilles récoltées en septembre, les unes atteintes de chlorose de vieillesse avec début de nécrose, les autres mortes, rousses, colonisées par de nombreux champignons; enfin le dernier lot comprend des feuilles mortes, brun-tabac foncé, où les mycéliums sont rares. Chaque échantillon est soumis à 2 macérations dans l'eau chloroformée suivies de 2 lavages à l'eau et l'ensemble des liqueurs ainsi obtenues constitue une fraction H. Celle-ci est abandonnée à l'air pour permettre son oxydation spontanée. Les feuilles sont alors traitées à deux reprises par une solution de $Na_4P_2O_7$ 0,1 m (fraction P) puis deux fois encore par NaOH 0,1 n (fraction N). Le C est dosé dans chaque fraction avec les résultats suivants, en milligrammes par gramme de feuille sèche :

FRACTIONS	H	P	N	Total
Feuilles chlorotiques	85,5	20,4	26,8	132,7
Feuilles rousses	36,6	9,7	17,1	63,4
Feuilles brun-noir	42,1	13,4	35,4	90,9

La fraction H flocule dans tous les cas par oxydation spontanée, mais à des taux différents : 10 % pour les feuilles chlorotiques, 6 % pour les feuilles mortes. On en peut conclure à l'identité de comportement des feuilles sénescentes et des feuilles vertes tandis qu'après la mort des tissus 51 à 57 % du C hydrosoluble sont éliminés par lessivage et minéralisation; ces chiffres sont bien conformes à ce que l'on sait de la décomposition des litières. Pourtant dans les feuilles noircies, le taux de C extractible par NaOH 0,1 n est supérieur de 32 % à celui des feuilles encore vivantes et, par acidification, l'extrait flocule à 50 % contre 30 % pour les deux autres lots.

Il faut en conclure que le lessivage des feuilles après leur mort est important mais très variable et que des condensations peuvent s'y produire en donnant naissance à des substances noires comparables à celles que HANDLEY (1954) a décrites, substances résistantes aux actions microbiennes et qui seront incorporées au sol, sans être liées à sa fraction minérale, comme conséquence de l'action mécanique des animaux et des facteurs climatiques.

Si l'on soumet des feuilles vertes à une macération aqueuse, on obtient, après une nuit, un liquide jaune pâle dont la teinte prend peu à peu une nuance grisâtre et un aspect opalescent, mais aucun précipité ne se forme. Ainsi que nous l'avons dit précédemment, ces extraits sont le siège d'oxydations semblables à celles qui se produisent dans les autolysats (cf. spectre U.V.), mais leur concentration est trop faible ou bien quelque constituant indispensable à une véritable précipitation y fait défaut.

Une macération aqueuse plus prolongée s'accompagne de fermentations qui compliquent les phénomènes et nous n'avons pas étudié ses résultats. Cependant il faut signaler qu'une fiole abandonnée pendant deux mois à la température ordinaire nous a fourni un bouillon de culture qui, exposé à l'air, a noirci en donnant un abondant précipité.

D'autre part, nous avons soumis un pied de *Melandryum* à des lessivages successifs : la plante est cultivée dans un vase de végétation, à l'extérieur, mais à l'abri des précipitations depuis le 22 novembre jusqu'au 5 janvier. Périodiquement ses parties aériennes sont immergées pendant 3 heures dans 1500 ml environ d'eau déminéralisée. Le macéré, après filtration sur coton de verre, est de teinte jaune pâle, légèrement opalescent, comme les extraits de feuilles obtenus par macération aqueuse. On l'évapore à température inférieure à 40° en le versant par petites fractions sur un mélange de 300 g de sable blanc et 6 g de bentonite. Au fur et à mesure des traitements, ce mélange se colore progressivement; en fin d'expérience, sa teinte générale est gris pâle et sa surface brun-noir, les constituants hydrosolubles s'y accumulant par migration ascendante; on peut aussi remarquer des grains d'argile agglomérée, gris foncés et très durs.

Nous avons procédé au total à 5 lessivages espacés de 8 jours, sauf le dernier

pour lequel nous avons attendu 15 jours. A ce moment il a été nécessaire d'éliminer les feuilles mortes avant de procéder à la macération. En y comprenant ces dernières, le poids de la matière sèche foliaire utilisée au cours de l'expérience s'élevait à environ 6,5 g.

Par dosage du C sur le mélange et sur un témoin, on constate que le premier s'est enrichi de 0,25 $^0/_{00}$ en C. Le feuillage de *Melandryum* a donc cédé au sol 11,6 mg de C par gramme de feuille sèche, soit en matière organique (coeff. 1,72) environ 2 % de son poids.

Nous avons alors soumis une fraction du mélange traité à une extraction par l'eau, puis à l'action du pyrophosphate de Na 0,1 m, ce qui nous a permis de préciser la répartition du C entre les différentes fractions; nous l'indiquons ci-dessous exprimée en % du C total :

Hydrosoluble		55 %
dont : précipitable à pH 1	39 %	
non précipitable à pH 1.	16 %	
Extractible par $Na_4P_2O_7$ 0,1 m		21 %
Non extractible (« humine »)		24 %

Ainsi, dans les conditions naturelles, se produisent des phénomènes comparables à ceux que nous avons enregistrés précédemment : les exsudats foliaires, par dessication en présence d'un support minéral se transforment en composés analogues aux différentes fractions des substances humiques et l'on remarque encore une fois la prépondérance des fractions non extractibles par le pyrophosphate et surtout des fractions peu polymérisées brunes (acides humiques solubles).

Dans une dernière étape, nous avons essayé de mettre en évidence, dans la nature, l'influence d'une population de *Melandryum* sur la répartition des fractions humiques du sol. Pour cela, nous avons procédé dans 5 stations différentes à des prélèvements jumelés, effectués aussi près que possible l'un de l'autre, d'une part sous *Melandryum,* d'autre part en l'absence de celui-ci : pratiquement, pour éviter des mélanges accidentels, dus par exemple au brassage par les animaux, on respecte entre les deux échantillons une distance de 0,50 à 2 m. De plus, à titre de référence, nous avons soumis aux même analyses les horizons Ao d'un podzol et A1 d'un sol noir riche en acides humiques gris. Comme méthode d'investigation, nous avons choisi la technique de DUCHAUFOUR et JACQUIN (1963) permettant de séparer les acides humiques bruns des acides humiques gris. Cependant, ici, la séparation s'effectue plutôt entre fractions mobiles [illegible], car si les premières sont toujours brunes, la teinte des secondes est variable et comprend tous les intermédiaires entre gris et brun. Nous avons complété enfin les indications ainsi obtenues en traitant à 2 reprises le résidu des extractions précédentes par NaOH 0,1 n. L'emploi de ce réactif a fait récemment l'objet de critiques sévères : il

est en effet capable, sans aucun doute, d'entraîner une humification artificielle de certaines substances organiques — la lignine lui est par exemple très sensible — mais nous avons appris que, parmi les deux fractions toujours fournies par les extraits et autolysats de *Melandryum,* il en était une qui demeurait insoluble dans le pyrophosphate et qu'il nous fallait donc rechercher par un agent d'extraction plus puissant.

Les résultats de nos analyses sont réunis dans le tableau II où ils sont exprimés par le rapport fraction mobile/fraction immobile. Il convient de rappeler que ces

TABLEAU II

Répartition des fractions humiques dans les sols, en présence de *Melandryum rubrum*

	pH	Fractions		
		I	II	III
Ao (Podzol humo-ferrugineux)	3,4	7,20	3,16	4,00
		B	G	G-B
Al (Sol noir de vallée)	7,6	4,05	0,14	0,06
		B	G	B-N
1*a* *Cornus sanguinea,* (*Acer campestre*) .	7,8	4,53	0,32	1,10
		B	N	B-N
1*b* les mêmes + *Melandryum*	7,9	7,08	0,39	1,70
		B	B-N	B-N
2*a* Forêt à *Quercus et Carpinus*	7,6	4,00	0,80	0,97
		B	B-G	B-N
2*b* Forêt + *Melandryum*	7,8	6,53	—	0,69
		B		B-N
3*a* sous prairie	6,1	4,25	0,05	1,92
		B	G-B	B-N
3*b* sous prairie + *Melandryum*	7,2	2,19	0,03	1,70
		B	B	B-N
4*a* Bord de chemin (Graminées, *Ranunculus sp...*)	7,5	3,61	1,79	2,37
		G-B	G	B-N
4*b* Graminées + *Melandryum*	7,7	6,67	0,88	1,47
		B	G	B-N
5*a* Végétation mixte : *Acer, Carex,* Graminées, *Ranonculus sp., Rubus*)	—	1,36	1,17	2,40
		G	G	B-G
5*b* *Melandryum* (*Acer, Rubus*)		1,98	1,40	1,40

Fractions : I = extrait par $Na_4P_2O_7 + NaCl$
II = extrait par $Na_4P_2O_7$
III = extrait par NaOH

Teintes : B = Brun
G = Gris
N = Noir

Les données numériques expriment le rapport $\frac{\text{ac. humiques mobiles}}{\text{ac. humiques immobiles}}$

fractions sont mesurées à l'intégrateur, à partir des courbes de densité optique des électrophorégrammes et que les résultats sont contrôlés par planimétrie. Enfin les teintes que nous avons mentionnées sont celles de la fraction immobile.

L'examen de ce tableau montre, en présence de *Melandryum :*

1) un accroissement très marqué de la fraction mobile brune, extractible par le mélange $Na_4P_2O_7$ + NaCl avec une seule exception concernant les échantillons n° 3 sous prairie. Sans doute d'autres plantes herbacées apportent-elles des substances de mêmes caractéristiques, mais l'interprétation des faits est compliquée, dans ce cas, par une importante différence de pH entre échantillons.

2) un accroissement non moins net de la fraction immobile obtenue par extraction à la soude. Une exception, correspondant à l'échantillon n° 1 ne peut être expliquée dans l'état actuel de nos travaux, mais nous savons que les autolysats de *Cornus sanguinea* se polymérisent spontanément à l'air avec formation de composés « humiques » bruns.

DISCUSSION

L'observation la plus élémentaire montre que l'humus revêt des teintes et des structures diverses, dans une même station, suivant la végétation sous laquelle il est prélevé et de nombreux travaux ont prouvé qu'il était qualitativement et quantitativement différent suivant le peuplement et le mode d'exploitation d'un sol donné.

La cause de cette différenciation des humus en relation avec les groupements de végétaux supérieurs doit sans doute être recherchée dans le mécanisme même de leur formation. Il ne peut être question ici de passer en revue l'énorme littérature consacrée aux synthèses humiques et nous nous contenterons de citer quelques travaux récents, représentatifs des différentes théories.

On admet le plus souvent que les substances humiques sont une conséquence de l'activité de la microflore du sol, dégradant et remaniant les constituants des débris végétaux ou synthétisant même directement des précurseurs originaux. Les composés aromatiques libérés ou élaborés par les microorganismes se condensent avec des substances azotées pour donner naissance aux différentes fractions de l'humus. Ces dernières, au cours d'une lente maturation se transforment en complexes de plus en plus condensés et dont le terme final est l'humine liée aux colloïdes minéraux.

Parmi les sources de noyaux aromatiques on a accordé une grande attention à la lignine qui représente au moins 5 à 20 % des débris végétaux incorporés au sol. Elle peut être fragmentée sous l'action de microorganismes lignivores et les maillons ainsi libérés s'engagent dans des complexes où dominent, semble-t-il, des

acides humiques bruns peu polymérisés, migrant facilement ou même des acides fulviques agressifs.

Si l'on ne met généralement pas en doute l'importance de la lignine en tant que source d'humus, on a tendance à mettre l'accent, aujourd'hui, sur d'autres possibilités : les hétérosides aromatiques, par exemple les tannins des végétaux supérieurs, sont hydrolysés au cours de la décomposition des tissus et les polyphénols libérés subiraient le même sort que dans le cas précédent. Certains travaux ont démontré la participation des constituants hydrosolubles de la plante à la synthèse des substances humiques : selon SHEKALOV et ILLJUVEVA (1962) la fraction hydrosoluble d'un foin de trèfle marqué par le 14 C détermine, 10 jours seulement après avoir été apportée au sol, la radioactivité des différentes fractions de l'humus : hydrosoluble, acides humiques et même humine. PROCH (1961) a étudié les liqueurs brunes formées en quelques jours par décomposition des litières et y a montré l'existence de substances humiques variables suivant l'espèce végétale et en particulier sa richesse en N. S'il ne paraît pas avoir observé la formation d'acides humiques au sens strict, il montre que les exsudats de feuilles mortes contiennent des produits floculables par les ions H^+ et Ca^{++} et de densité optique élevée lorsque la plante est riche en protéines. Enfin ces produits sont en partie fixés par les colloïdes du sol. On voit combien ces résultats sont proches des nôtres.

Enfin on sait que divers champignons et actinomycètes synthétisent des pigments apparentés aux substances humiques.

Dans tous les cas précédents, la plante influe sur le type d'humus formé, moins par les matières premières qu'elle fournit à ces synthèses, car elles sont profondément altérées par les actions microbiennes, que par l'effet exercé par ses débris sur la composition et l'activité de la microflore et de la microfaune.

A ces conceptions « microbiologiques » des synthèses humiques s'oppose l'idée que les polyphénols végétaux peuvent s'oxyder et se condenser dans la plante elle-même à la mort de ses organes : BLOOMFIELD (1957) expliquait ainsi le noircissement des feuilles de tremble après leur chute. SWABY et LADD (1962) estiment que les composés humiques ne peuvent résulter de transformations lentes au cours desquelles les actions microbiennes ne manqueraient pas de détruire les molécules fondamentales participant à leur synthèse. Cette dernière intervient dans la cellule végétale ou microbienne, par condensation de radicaux libres formés enzymatiquement au moment des processus d'autolyse. Les acides humiques atteindraient le sol seulement après rupture des membranes squelettiques. On retrouve ici le cas des feuilles brun-noir de *Melandryum,* dont nous avons discuté plus haut. Mais nous avons remarqué comment, dans le cas de notre plante, il y avait là une possibilité et non une règle. Bien plus, nous avons observé comment les extraits aqueux pouvaient subir une longue fermentation anaérobie sans perdre l'aptitude à brunir et précipiter.

Quant aux polyphénols exsudant des plantes vivantes, ils n'ont guère été envisagés que comme agents d'entraînement du fer.

Nos observations ne nous conduiront point à choisir entre ces diverses théories, peut-être parce que chacune correspond en partie à la réalité. En effet les indications que nous avons recueillies et dont nous venons de présenter les points essentiels, montrent les faits suivants :

1) Les autolysats de feuilles vivantes renferment des substances capables de se transformer en produits sombres et comprenant, dans le cas de *Melandryum,* des fractions correspondant à toutes les catégories de substances humiques depuis les « précurseurs » hydrosolubles jusqu'à l'« humine ». Nous montrons, en particulier, que la fraction soluble dans NaOH 0,1 n présente une série de propriétés caractéristiques des acides humiques extraits de certains sols : solubilité, floculation, spectres dans le visible et l'I. R., mobilité électrophorétique. Si de telles substances existent dans le sol aucune technique ne permet de les distinguer de ce que l'on désigne couramment sous le nom d'humus. Un aspect particulièrement curieux est la formation très rapide, *in vitro* d'une fraction « humine » pure, non liée à un support argileux.

2) La formation de ces produits est le résultat de phénomènes oxydatifs de nature enzymatique, dans lesquels interviennent des complexes peroxydasiques hautement actifs et présents dans la feuille. Ces phénomènes se déroulent en milieu aseptique (autolysats stérilisés par filtration) comme dans les conditions où l'activité microbienne est suspendue (présence de $CHCl_3$). Si donc les microorganismes ne semblent pas intervenir dans la formation de ces produits, rien ne prouve non plus qu'ils empêchent leur apparition (expérience de fermentation anaérobie). Enfin l'étude des spectres U. V. nous a montré que des phénomènes du même ordre se produisaient dans les extraits obtenus par simple macération aqueuse et donc, probablement, dans les exsudats naturels.

3) Ces processus sont accélérés par la dessication en présence de sol et surtout de colloïdes argileux, conduisant ainsi à la formation de complexes argilo-humiques synthétiques. Des résultats semblables peuvent être obtenus en remplaçant l'autolysat de feuilles par les eaux de lessivage d'une plante vivante. Dans les deux cas, le sol s'enrichit en matières organiques où prédominent les deux fractions suivantes :

— des acides humiques facilement extractibles par le réactif $Na_4P_2O_7$ + NaCl. Ce sont des produits peu polymérisés, bruns et mobiles à l'électrophorèse.

— des substances très polymérisées, insolubles ou solubles seulement dans NaOH 0,1 n et immobiles à l'électrophorèse.

Au cours d'expériences dont nous rendrons compte ailleurs, nous avons étudié, *in vitro*. la décomposition de feuilles de *Melandryum* et nous avons pu extraire de la litière et du sol sous-jacent ces deux mêmes fractions. Enfin on a vu

que, dans la nature, les sols portant cette espèce s'enrichissent généralement en acides humiques bruns mobiles et en substances non mobiles extractibles seulement par la soude.

Il n'est pas douteux que nous avons affaire ici à un matériel particulièrement favorable en raison de son rendement en produits de brunissement et de la qualité de ceux-ci, notamment de leur degré élevé de polymérisation. De ces points de vue, *Melandryum* ne constitue certes pas un cas unique. Cependant, ces réserves faites, il nous semble pouvoir, sans audace excessive, formuler les conclusions générales suivantes :

L'humus a des origines diverses s'exprimant dans la variabilité de ses caractères et de sa composition : il dérive, d'une part, de la transformation directe ou orientée par les microorganismes (parasites ou saprophytes) de certains constituants solubles ou facilement hydrolysables libérés par la plante pendant sa vie et à la mort de ses organes. Au premier abord, les liquides bruns s'écoulant des feuilles mortes semblent avoir plus d'importance que les liqueurs presque incolores fournies par le lessivage de la plante vivante. Pourtant, dans le cas de *Melandryum,* ce dernier phénomène cède au sol des quantités importantes de matières organiques (2 % du poids de la masse foliaire sèche en 6 semaines seulement) et celles-ci se retrouvent, après simple dessication, pour une large part (45 %), sous des formes analogues aux acides humiques et à l'humine.

Il paraît raisonnable d'admettre que cette première phase exerce une influence directe sur la synthèse des fractions les plus spécifiques de l'humus : c'est du moins ce que nous a montré l'analyse des acides humiques extraits d'un sol à *Melandryum*. Suivant les végétaux, exsudats et autolysats sont plus ou moins riches en matière sèche, celle-ci est inégalement stimulante pour la microflore, inégalement apte à s'oxyder et à se condenser; les produits de sa transformation, spontanée ou provoquée par les microorganismes seront les uns insolubles ou floculables par les cations polyvalents, les autres solubles ou même agressifs et tous les intermédiaires sont possibles entre ces divers comportements.

D'autre part, après la mort des feuilles, leur lessivage est plus ou moins rapide suivant les espèces — on connaît à ce point de vue les différences existant entre conifères et « feuillus » — mais il tend à ne plus laisser subsister des débris végétaux que les constituants des parois cellulaires. Or ces derniers sont évidemment moins variables que les fractions solubles. Cependant leur plus ou moins grande résistance aux agents biologiques, leurs proportions respectives, les liaisons qu'ils ont pu contracter avec d'autres substances exercent sur la composition et l'activité de la microflore des effets déterminants et dont l'importance n'est pas inférieure à celle des facteurs édaphiques. On comprend comment la plante peut encore contribuer, mais désormais de façon indirecte, à régler la nature des synthèses humiques.

BIBLIOGRAPHIE

ARENS (F.), 1934. — Die kutikuläre exkretion des Laubblattes. *Jahrb. wiss. Bot.*, **80**, 248-300.

BLOOMFIELD (C.), 1957. — The possible significance of polyphenols in soil formation. *J. Sci. Food Agric.*, 8, 7. 389-392.

COULSON (C. B.), DAVIES (R. I.), LEWIS (D. A.), 1960. — Polyphenols in plant, humus and soil. II. *J. Soil Sci.*, **11**, 1. 30-44.

DALBROS (S.), 1955. — Leaching of nutrients from apple foliage. *Report XIV intern., hortic. Congr.*, 770-778.

DUCHAUFOUR (P.), JACQUIN (F.), 1963. — Recherche d'une méthode d'extraction et de fractionnement des composés humiques, contrôlée par l'électrophorèse. *Ann. Agron.*, **14**, 6. 885-918.

GOLTERMAN (H. L.), 1960. — Studies on the cycle of elements in fresh water. *Acta bot. neerland.*, **9**, 1-58.

HANDLEY (W. R. C.), 1954. — Mull and mor formation in relation to forest soils. *Forestry Comm. Bull.*, n° 23, 115 p.

JACQUIN (F.), MANGENOT (F.), 1964. — Formation de composés de type humique à partir d'extraits aqueux de *Melandryum silvestre* (Schkuhr.) Roehl. *C. R. Acad. Sc. Paris.*, **258**, 4607-4610.

JOHNSTON (H. H.), 1965. — The relationship of brown humus to lignin. *Plant and Soil.*, **21**, 2. 191-200.

JUSTE (C.), DUREAU (P.), 1964. — Etude par spectroscopie infra-rouge de différentes fractions d'acides humiques extraites d'un podzol humo-ferrugineux développé sur sable quartzeux. *C. R. Acad. Sc. Paris.*, **259**, 612-614.

MANGENOT (F.), 1963. — Préparation d'autolysats de feuilles destinés à la culture de parasites maculicoles. *Bull. Ec. nat. sup. agron., Nancy.*, **5**, 2, 173-188.

MORGAN (J. V.), TUKEY (H. B. Jr), 1964. — Characterization of leachate from plant foliage. *Plant Physiology*. **39**, 4, 590-593.

PROCH (J.), 1961. — Zusammensetzung und Eigenschaften des wasserlöslichen Humus. *Wiss. Z. Hochsch. landw. Prod. gen. Meissen*, **4**, 87-96. Rés. in *Soil Fertilizers*, 1963, n° 616.

SCHARPENSEEL (H. W.), KŒNIG (E.), MENTHE (E.), 1964. — Infra-rot und differential-Thermo-Analyse an Huminsäureproben aus verschiedenen Bodentypen, aus Wurmkot und Streptomyceten. *Z. PflzenErnähr., Düng., Bodenkde*, **106**, 2. 134-149.

SHEKALOV (K. I.), ILLJUVEVA (V. P.), 1962. — Primenenie izotopa C^{14} pri izuchenii processov razlozhenija organicheskovo veshchestva v pochve. *Pochvovedenie* 1962, n° 5, 40-50.

SØRENSEN (H.), 1962. — Decomposition of lignin by soil bacteria and complex formation between autoxidized lignin and organic nitrogen compounds. *J. gen. Microbiol.*, **27**, 21-34.

SWABY (R. J.), LADD (J. N.), 1962. — Chemical nature, microbial resistance, and origin of soil humus. Trans. intern. Soil Conf. N. Zeal., Comm. IV-V, 3-8.

TUKEY (H. B. Jr), TUKEY (H. B. Sr), 1962. — The loss of organic and inorganic materials by leaching from leaves and other above ground plant parts. *Radioisot. in Soil-Plant Nutr. Stud.*, 289-302.